

**Deteksi *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus
(MrNV) dengan metode *reverse transcription -
polymerase chain reaction* (RT-PCR)**



© BSN 2014

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip umum	2
4 Peralatan.....	2
5 Bahan.....	3
6 Prosedur kerja.....	3
7 Interpretasi Hasil	6
8 Jaminan mutu	6
Lampiran A (normatif) Penyiapan regensia	7
Bibliografi	8



Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan jaminan mutu komoditas perikanan budidaya serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus (MrNV) dengan metode *reverse transcription - polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis (PT) 65-07 Perikanan Budidaya dan dibahas dalam rapat konsensus pada tanggal 26 Agustus 2013 di Bogor yang dihadiri oleh anggota panitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER. 19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep. 03/Men/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina.
6. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 8 November 2013 sampai dengan 6 Januari 2014 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (MrNV) dengan metode *reverse transcription - polymerase chain reaction* (RT-PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Macrobrachium rosenbergii nodavirus* (MrNV) menggunakan metode *reverse transcription - polymerase chain reaction* (RT-PCR).

2 Istilah dan definisi

Untuk tujuan dan penggunaan dalam dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan.

2.1

amplifikasi

proses penggandaan asam deoksiribonukleat (cDNA) secara *in vitro* menggunakan enzim polimerase

2.2

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

2.3

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

2.4

deoxyribo nucleic acid (DNA)

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula deoksiribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, timin)

2.5

ekstensi

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA *polymerase*, sehingga akan terbentuk 2 buah DNA untai tunggal

2.6

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik

2.7

kontrol negatif

kendali hasil reaksi RT-PCR dengan menggunakan *template* berupa RNase *free water* dan RNA negatif MrNV untuk mengetahui terjadinya suatu kontaminasi dari dalam pada pelaksanaan RT-PCR

2.8

kontrol positif

kendali hasil reaksi RT-PCR dengan menggunakan *template* berupa RNA yang sudah diketahui pasti berasal dari organisme target identifikasi

2.9

primer

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

2.10

RNA

materi genetik yang tersusun atas nukleotida dengan gula ribosa, gugus fosfat, dan basa nitrogen (guanin, adenin, sitosin, urasil)

2.11

RT-PCR

proses PCR yang didahului dengan sintesis cDNA dari RNA menggunakan enzim transkrip balik (*reverse transcriptase*)

2.12

RNA template

sekuen RNA tertentu yang akan ditranskripsi balik dan diamplifikasi

2.13

Reverse Transcription (RT)/ transkripsi balik

proses pembentukan DNA komplemen (cDNA) dari RNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*

2.14

supernatan

cairan jernih berada pada lapis atas setelah suatu suspensi disentrifus

3 Prinsip umum

Prinsip dari metode ini adalah mengisolasi dan memurnikan RNA dari organ target/jaringan yang diduga terinfeksi *MrNV*, dilanjutkan dengan transkripsi balik untuk mensintesis cDNA yang seterusnya mengamplifikasi cDNA.

4 Peralatan

- a) alat pengukur konsentrasi asam nukleat berbasis UV *spectrophotometry*;
- b) *dissecting set*;
- c) *freezer* (suhu -20 °C atau lebih rendah);
- d) *laminar air flow cabinet*;
- e) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;
- f) *minimixer*;
- g) *microwave/hot plate*;
- h) *rack ice block*;
- i) *refrigerated centrifuge*;
- j) *spindown centrifuge*;
- k) 1 set alat dokumentasi gel;
- l) 1 set alat elektroforesis gel agarose;
- m) *thermal cycler*;
- n) timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- o) UV transiluminator.

5 Bahan

- a) agarosa;
- b) bufer TN (20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl pH 7,4);
- c) bufer TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA pH 7,5);
- d) β -mercaptoethanol;
- e) etanol absolut p.a;
- f) *filtered microtip* berbagai ukuran 10 μ l – 1 000 μ l;
- g) *isopropanol* (2-propanol);
- h) kit ekstraksi RNA komersial;
- i) kloroform;
- j) larutan pembersih kontaminan RNA dan RNase;
- k) larutan preservatif RNA;
- l) larutan *ethidium bromide* 10 mg/ml;
- m) larutan *TAE 1X*;
- n) *6 x loading dye*;
- o) masker;
- p) *marker DNA* (100 bp DNA ladder);
- q) *one step RT-PCR* (kit komersial);
- r) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- s) *RNase free water*;
- t) sarung tangan (*powder - free*);
- u) 1 set primer *MrNV* :
Forward : 5' –GCG-TTA-TAG-ATG-GCA-CAA-GG-3'
Reverse : 5'-AGC-TGT-GAA-ACT-TCC-ACT-GG -3'
- v) tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml.

6 Prosedur kerja

6.1 Persiapan contoh uji

- a. Telur, larva, dan pascalarva
Contoh uji diambil utuh.
- b. Juvenil sampai dewasa
Contoh uji diambil dari bagian kaki renang, otot abdomen, otot ekor atau insang baik segar maupun beku (-20 °C) atau yang sudah diawetkan. Pengawetan dilakukan dengan menambahkan campuran gliserol dan etanol absolut p.a dengan perbandingan 20 : 80 atau larutan preservatif RNA.

6.2 Ekstraksi RNA

6.2.1 Metode presipitasi

- a) bersihkan alat dan tempat menggunakan larutan pembersih RNase;
- b) gerus 50 mg - 100 mg contoh uji dalam 300 μ l bufer TN menggunakan *pellet pestle*;
- c) sentrifugasi pada 12 000 x g selama 15 menit pada 4 °C;
- d) pindahkan 150 μ l supernatan kedalam tabung mikro baru dan tambahkan 1 ml *Trizol Reagent*, kemudian homogenkan;
- e) inkubasikan selama 5 menit pada 15 °C – 30 °C;
- f) tambahkan 200 μ l kloroform, homogenkan, kemudian sentrifugasi pada 12 000 x g selama 15 menit pada 4 °C;
- g) pindahkan cairan lapisan paling atas (fase air) ke dalam tabung mikro baru;
- h) tambahkan *isopropanol* (2-propanol) sebanyak 500 μ l;

- i) inkubasikan pada 15 °C – 30 °C selama 10 menit, kemudian sentrifugasi pada 12 000 x g selama 10 menit pada 4 °C;
- j) buang cairan, cuci *pellet* RNA dengan 1 ml etanol 75%, kocok dengan *minimixer* dan sentrifugasi pada 7 500 x g selama 5 menit pada 4 °C;
- k) keringanginkan *pellet* RNA selama 10 menit;
- l) larutkan *pellet* RNA dengan 50 µl RNase *free water* atau bufer TE;
- m) ukur konsentrasi RNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm (A_{260});
- n) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- o) periksa kemurnian RNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280});
- p) simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada -80 °C dalam bentuk *aliquot*.

CATATAN 1 prosedur diatas menggunakan *TRIzol Reagent*.

CATATAN 2 ekstraksi RNA juga dapat menggunakan kit komersial atau metode standar lainnya

6.2.2 Metode *spin column*

- a) masukkan 20 mg - 30 mg contoh uji ke dalam tabung mikro yang berisi 600 µl bufer RLT (*Lysis buffer*) yang telah ditambahkan 6 µl β -mercaptoethanol, gerus menggunakan *pellet pestle*;
- b) sentrifugasi pada 12 000 x g selama 3 menit pada 4 °C;
- c) pindahkan 500 µl supernatan ke dalam tabung mikro baru (1,5 ml), tambahkan 500 µl etanol 70%, homogenkan;
- d) pindahkan 700 µl contoh uji ke dalam *spin column* yang sudah dipasang *collection tube* 2 ml, sentrifugasi pada 8 000 x g selama 15 detik. Buang cairan di dalam *collection tube*;
- e) tambahkan 700 µl bufer RW1 (*wash buffer*) ke dalam *spin column*, sentrifugasi pada 8 000 x g selama 15 detik, buang cairan pada *collection tube*;
- f) tambahkan 500 µl bufer RPE (*wash buffer*) ke dalam *spin column*, sentrifugasi pada 8 000 x g selama 15 detik, buang cairan pada *collection tube*;
- g) tambahkan 500 µl bufer RPE (*wash buffer*) ke dalam *spin column*, sentrifugasi pada 8 000 x g selama 2 menit, buang cairan pada *collection tube*;
- h) ganti *collection tube* dengan tabung mikro steril 1,5 ml, tambahkan 30 µl - 50 µl RNase-free water langsung ke membran *spin column*, sentrifugasi pada 8 000 x g selama 1 menit untuk melarutkan RNA;
- i) ukur konsentrasi RNA dengan alat pengukur konsentrasi asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm (A_{260});
- j) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- k) periksa kemurnian RNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280});
- l) simpan larutan RNA pada -20 °C apabila segera digunakan dan untuk penyimpanan lebih lama pada -80 °C dalam bentuk *aliquot*.

CATATAN 1 Prosedur di atas menggunakan kit komersial *Qiagen RNeasy Mini kit*

CATATAN 2 Ekstraksi RNA juga dapat menggunakan kit komersial lainnya

6.3 Transkripsi balik dan amplifikasi

- a) cairkan (*thawing*) RNA template, primer, dNTP Mix, *One Step RT PCR Buffer* dan RNase-free water, letakkan di atas es;

- buat preparasi *cocktail* sesuai dengan Tabel 1. Siapkan volume *cocktail* 10% lebih banyak dari yang dibutuhkan;
- homogenkan semua bahan *cocktail* dan distribusikan 23 µl ke masing-masing tabung mikro;
- tambahkan 2 µl template RNA (10 ng - 100 ng) contoh uji, sertakan contoh kontrol positif dan kontrol negatif dan kontrol non *template* (*blanko*);
- lakukan transkripsi balik dan amplifikasi, sesuai Tabel 2.

CATATAN 1 Prosedur diatas menggunakan kit komersial One step RT-PCR kit (Qiagen)

CATATAN 2 Transkripsi balik dan ampifikasi juga dapat menggunakan kit komersial lainnya

Tabel 1 - Komposisi *cocktail* untuk RT-PCR

No	Komponen	Volume per reaksi (µl)	Konsentrasi Akhir
	Master Mix		
1	<i>OneStep</i> RT-PCR Buffer 5x	5	1x
2	dNTP Mix 10 mM	1	400 µM masing-masing dNTP
3	Primer <i>Forward</i> 15 µM	1	0,6 µM
4	Primer <i>Reverse</i> 15 µM	1	0,6 µM
5	<i>Enzym</i> RT PCR mix	1	-
6	RNase-free water	14	-
	Total	23	

Tabel 2 - Program transkripsi balik dan amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Transkripsi balik	50	30 menit	
Aktivasi <i>hot start</i> Taq DNA polymerase	95	15 menit	-
Denaturasi	94	40 detik	40
<i>Annealing</i>	55	40 detik	
Ekstensi	72	1 menit	
Ekstensi akhir	72	10 menit	

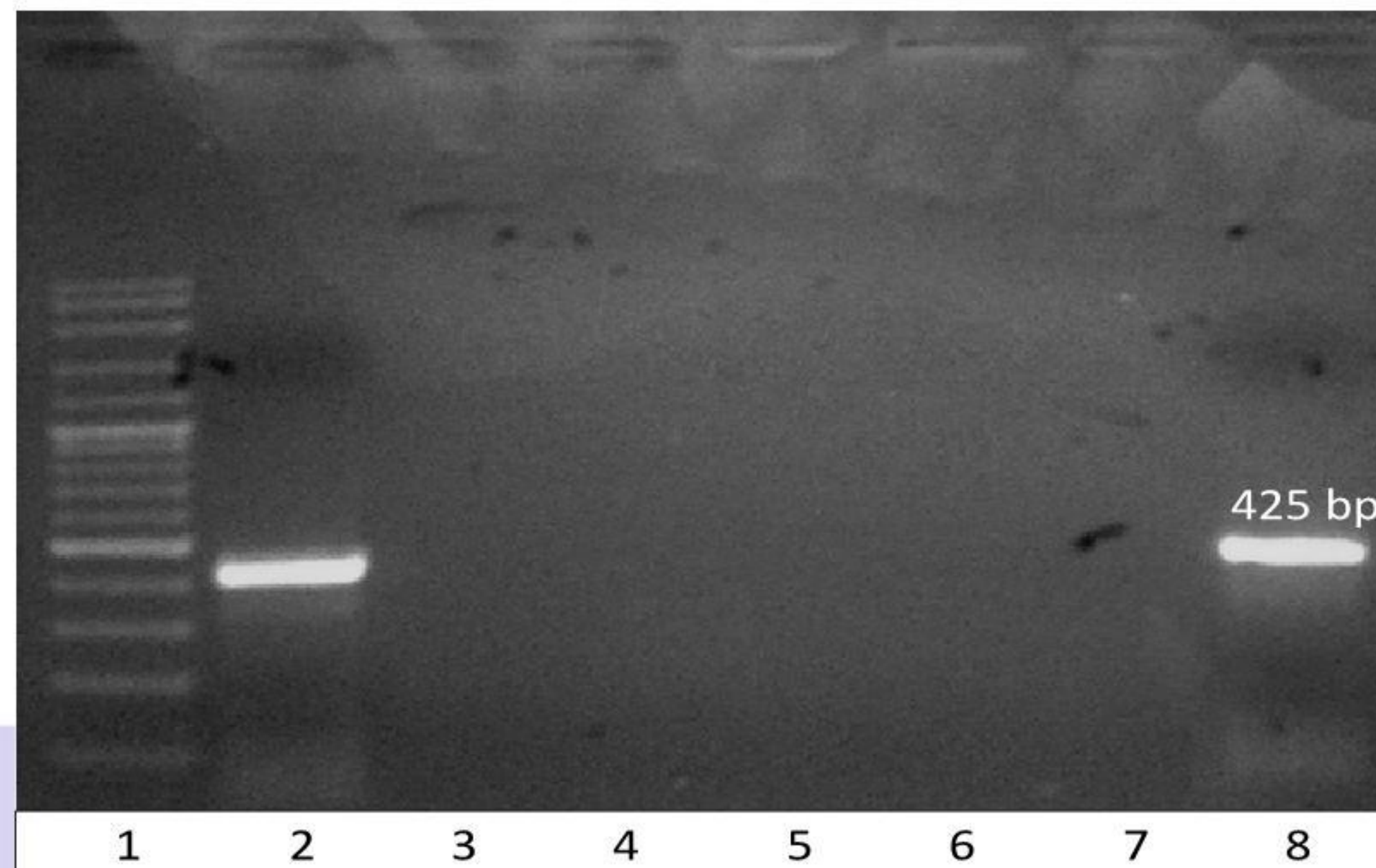
6.4 Elektroforesis

- letakkan 1,5% gel agarosa ke elektroforesis *chamber*;
- tambahkan larutan TAE ke dalam elektroforesis *chamber* hingga gel agarosa terendam;
- siapkan 2 µl *loading buffer* di atas *parafilm* sesuai jumlah contoh dan 1 *marker*;
- ambil contoh uji hasil PCR sebanyak 10 µl dan campur dengan *loading buffer*;
- masukkan ke dalam sumur dengan menggunakan mikropipet disertakan juga *marker* DNA sebanyak 2 µl;
- setelah semua contoh uji disuntikkan, pasang tutup elektroforesis *chamber* dan hidupkan listrik dengan voltase diatur 120 V;
- hentikan elektroforesis setelah pewarna *bromphenol blue* mencapai 2/3 bagian panjang gel agarosa.

CATATAN Pembuatan gel agarosa seperti pada lampiran A.

7 Interpretasi Hasil

- a) Gel agarosa diamati di atas UV *transilluminator*:
- kontrol negatif (blanko/akuabides): tidak terlihat adanya pita berukuran 425 bp;
 - kontrol negatif (RNA selain *MrNV*): tidak terlihat adanya pita berukuran 425 bp;
 - kontrol positif (RNA *MrNV*): terlihat adanya pita berukuran 425 bp;
 - contoh uji positif *MrNV*: terlihat adanya pita berukuran 425 bp;
 - contoh uji negatif *MrNV*: tidak terlihat adanya pita berukuran 425 bp.
- b) Dokumentasikan hasil dengan UV *gel documentation* (Gambar 1)



Keterangan gambar:

- 1 : *Marker* (100 bp DNA ladder)
- 2 : Kontrol positif (RNA *MrNV*)
- 3 : Kontrol negatif RNAMrNV4 : Kontrol negatif (*blank*)
- 5-7 : Contoh uji tidak terdeteksi terinfeksi *MrNV*
- 8 : Contoh uji terdeteksi terinfeksi *MrNV*

Gambar 1 - Contoh elektroforegram produk RT- PCR *MrNV*

8 Jaminan mutu

- a) semua tahapan pengerjaan diawali dengan membersihkan meja kerja dan alat menggunakan larutan pembersih kontaminan RNase;
- b) hasil ekstraksi RNA mempunyai rasio A_{260}/A_{280} berkisar 1,8 – 2,1;
- c) proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan 2 kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.

Lampiran A
(normatif)
Penyiapan regensia

A.1 Larutan *Ethidium bromide* 10 mg/ml

Cara membuat:

- a) tambahkan 10 mg *ethidium bromide* ke dalam 1 ml akuades;
- b) aduk sampai *ethidium bromide* larut;
- c) pindahkan ke dalam botol gelap dan simpan pada 25 °C – 30 °C.

A.2 Pembuatan gel agarosa 1,5%

Cara membuat:

- a) timbang agarosa sebanyak 1,5 g tambahkan 100 ml bufer TAE 1x;
- b) didihkan dalam *microwave/hot plate* sampai larutan menjadi bening;
- c) biarkan larutan sampai 60 °C, tambahkan 1 µl *ethidium bromide*, homogenkan;
- d) tuangkan agarosa ke dalam cetakan yang telah diberi sisir;
- e) biarkan memadat, gel siap digunakan.

Bibliografi

Invitrogen. 2009. Manual of RNA Extraction. Trizole Invitrogen

OIE, 2012. Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal Office des International des Epizooties (OIE) Chapter 2.2.7

Qiagen. 2008. Manual ; OneStep® RT-PCR kit Handbook For fast and highly sensitive one-step RT-PCR

Qiagen. 2010. Manual ; RNeasy® Mini Handbook

